

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)  
分担研究報告書

ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究

(3)ダイオキシン類の迅速測定法及び分析の精密化に関する研究  
(3-1)食品中のダイオキシン類測定迅速法の開発(Ah イムノアッセイ)

分担研究者 豊田正武 実践女子大学教授(元国立医薬品食品衛生研究所・食品部長)

研究要旨

市販魚中のダイオキシン類の毒性等量を推測するスクリーニング法として、Ahイムノアッセイキットの検討を行った。魚試料はアルカリ分解後、クリーンアップを行い、PCDD/Fs及びnon-ortho PCBs分画を本法により測定した。その結果、従来法であるHRGC/HRMS分析のPCDD/Fs及びnon-ortho PCBs毒性等量値と良好な相関が得られた( $r = 0.92$ )。さらに、従来法におけるmono-ortho PCBsを含めた総ダイオキシン類毒性等量に対しても相関は良好であった( $r = 0.88$ )。本法は、安価で簡便にダイオキシン類測定が可能であるため、ダイオキシン類のスクリーニング法として有用であると考えられる。しかしながら、操作ブランク値が高く認められ、低濃度汚染試料の数値化が困難であることが示唆された。今後は、より詳細なダイオキシン類測定に関する評価を行い、信頼性を高めていく必要があると考えられる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所・食品部

堤 智昭、天倉吉章

株式会社 クボタ

中西俊夫、小林康男、山田隆生

株式会社 日新環境調査センター

芦枝和典

A.研究目的

ダイオキシン類の摂取は、そのほとんどが食事経由である。わが国では、特に魚介類を介したダイオキシン類の摂取が多いため<sup>1)</sup>、魚介類のダイオキシン類の毒性等量(TEQ)濃度を迅速に測定できる方法が開発されれば、食品衛生上有意義である。

ダイオキシン類は生体内において芳香族炭化水素レセプター(AhR)と結合する。その後、AhR nuclear translocator (ARNT)と複合体を形成し、特定のDNA領域(dioxin responsive element; DRE)と結合後、毒性を誘発すると考えられている。この毒性発現メカニズムを利用したダイオキシン類検出法の一つにAhイムノアッセイがある。本法はダイオキシン類とAhR、ARNT及びDREの複合物を、96ウェルマイクロプレートに固相化した後、ARNT

に対する抗体によりダイオキシン類の複合物を定量する方法である(図1)。本法の特徴としては下記の点が上げられる。

1. 分析時間が短時間である(約6時間)。
2. 培養細胞を使用しないため、特別な機器を必要としない。
3. 96ウェルマイクロプレートを使用して行うため、多数検体処理能を有する。
4. 既にキット化されているため、汎用性が高い。

従って、ダイオキシン類のスクリーニング法として、有用な特徴を有すると考えられた。そこで本研究では、Ahイムノアッセイによる、市販魚中のダイオキシン類測定の検討を行った。

B.研究方法

1.試薬、試液及び器具

Ahイムノアッセイのための前処理で使用するアセトン、ジクロロメタン、ヘキサン、メタノール、トルエンはダイオキシン類分析用(関東化学㈱)を用いた。水酸化カリウム、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、無水硫酸ナトリウム及び硫酸は関東化学㈱製の特級試薬を使用した。多層シリカゲルカラムは、PCB分析用(和光純薬工業㈱)のシリカゲル、ダイオキシン類分析用(和光純薬工業㈱)の

2%(w/w)水酸化カリウムシリカゲル、10%(w/w)硝酸銀シリカゲル、22%(w/w)硫酸シリカゲル及び44%(w/w)硫酸シリカゲルを使用し、食品のダイオキシン分析暫定ガイドライン<sup>2)</sup>に従って作製した。アルミナカラムは、ダイオキシン分析用(ICN社)を使用し、ガイドライン<sup>2)</sup>に従って作製した。硫酸シリカゲルカラムはガラス製カラム(内径15 mm & 長さ300 mm)に、シリカゲル(0.2 g)、44%硫酸シリカゲル(6 g)、及び無水硫酸ナトリウム(4 g)を順次、充填し作製した。また、Ah イムノアッセイのキットはクボタ(株)より購入した。

高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)分析で使用した溶媒は、全てダイオキシン類分析用(関東化学(株))を使用した。シリカゲルはPCB分析用(和光純薬工業(株))、10%硝酸シリカゲルはダイオキシン分析用(和光純薬工業(株))、アルミナはダイオキシン分析用(ICN社)、活性炭は活性炭分散シリカゲル(関東化学(株))を使用し、各カラムは食品のダイオキシン分析暫定ガイドライン<sup>2)</sup>に従い作製した。ダイオキシン類標準品はWellington社製を使用した。

## 2. 試料

魚試料は、東京都内のスーパーマーケットで購入した。筋肉部をホモジナイザーで均一化し使用した。

## 3. 装置

ホモジナイザーは(株)日本精機製作所製マルチブレンダーミルを用いた。また、吸光マイクロプレートリーダーはTECAN社製サンライズクラシックを、HRGC/HRMSは日本電子製(JMS-700)を使用した。

## 4. Ah イムノアッセイによる魚試料中のダイオキシン類測定

### 4-1) 前処理

均一化した魚試料(湿重量ベースで20 g)を採取し、2 mol/L 水酸化カリウム水溶液(約50 ml)を加え、アルカリ分解(室温で16時間)を行った。メタノール(50 ml)を加えた後、ヘキサン(50 ml)により振とう抽出(10分×3回)を行った。ヘキサン抽出液を、2%(w/v)塩化ナトリウム水溶液(50 ml)により2回洗浄後、少量の濃硫酸を加え、硫酸処理を行った。硫酸層に着色が認められなくなるまで、

繰り返し硫酸洗浄を行った後、2%(w/v)塩化ナトリウム水溶液(50 ml)により3回洗浄した。無水硫酸ナトリウムにより脱水後、減圧下で濃縮を行った。濃縮液は多層シリカゲルカラムに添加し、ヘキサン(220 ml)で溶出を行った。溶出液は減圧下で濃縮後、アルミナカラム(15 g)に添加し、ヘキサン(150 ml)で洗浄後、2%(v/v)ジクロロメタン/ヘキサン(200 ml)によりMono-*ortho* PCBs分画を溶出、さらに60%(v/v)ジクロロメタン/ヘキサン(200 ml)によりNon-*ortho* PCBs及びPCDD/Fs分画を溶出した。Non-*ortho* PCBs及びPCDD/Fs分画は減圧下で濃縮後、硫酸シリカゲルカラムに添加し、ヘキサン(100 ml)で溶出を行った。溶出液は減圧下で濃縮後、DMSO(20 µl)に置換し、Ahイムノアッセイに供した。なお図2に、前処理法の概略を示した。

### 4-2) Ah イムノアッセイ

Ah イムノアッセイの手順はキットの説明書に従った。2,3,7,8-TCDD 標準液あるいは前処理済の試料を、活性化 cytosol (AhR, ARNT 及び DRE を含む)と混合した(DMSOの最終濃度は1%)。96 ウェルプレートに混合液(200 µl/ウェル)を入れ、30°Cで2時間インキュベーションした。Wash Bufferで3回洗浄後、1次抗体液(200 µl/ウェル)をプレートに加え、30°Cで1時間インキュベーションした。その後、Wash Bufferで3回洗浄し、2次抗体(200 µl/ウェル)をプレートに加え、30°Cで1時間インキュベーションした。Wash Bufferで3回洗浄後、基質溶液(200 µl/ウェル)を加え、30°Cで30分間インキュベーション後、マイクロプレートリーダーにより吸光度(405 nm)を測定した。試料中のダイオキシン類濃度は、得られた吸光度からバックグラウンド(溶媒対照の吸光度)を差し引いた後、標準曲線の吸光度と比較し、2,3,7,8-TCDD換算量(Ah immunoassay-based TEQ)として表した。また、操作ブランク値が認められた場合は、試料の測定値よりブランク値を差し引き数値化した。

## 5. HRGC/HRMSによる魚試料中のダイオキシン類測定

平成13年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)分担研究報告書(1-2)(ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究)と同様に行った。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 前処理操作の確立

一部の Mono-ortho PCBs が多量に共存した場合、AhR に対するアンタゴニスト作用により本法で得られる測定値が抑制されることが指摘されている<sup>3)</sup>。魚試料では Mono-ortho PCBs が多量に存在する場合がある。その結果、Mono-ortho PCBs 共存下では偽陰性の結果が得られることが予測され、スクリーニング法の性質として望ましくない。また、Mono-ortho PCBs は毒性等価係数(TEF)が小さく総 TEQ 濃度中で占める割合が低い場合が多いことから、測定対象に含めなくても、おおよその TEQ 濃度を把握するには十分と考えられた。そこで本研究では、前処理操作においてアルミナカラムにより Mono-ortho PCBs を分離した後、Non-ortho PCBs 及び PCDD/Fs 分画を Ah イムノアッセイにより測定する方法を選択した(図 2)。前処理操作におけるダイオキシン類の回収率を、HRGC/HRMS により求めた結果を表 1 に示した。60%ジクロロメタン/ヘキサン分画(測定対象分画)における Non-ortho PCBs 及び PCDD/Fs 異性体の回収率は70%以上であり、良好な値であった。また、測定分画に Mono-ortho PCBs は、ほとんど回収されておらず、アルミナカラムの分画は良好であった。

### 2. 魚試料の測定

Ah イムノアッセイと、従来法である HRGC/HRMS 分析のダイオキシン分析の相関を検討するため、市販魚試料(13 検体)に対して比較試験を行った(表 2)。同一の測定対象物(Non-ortho PCBs 及び PCDD/Fs 測定値)に対して比較した場合、Ah イムノアッセイは従来法と比較し、2~3 倍の TEQ 値が得られる場合が多かった。しかし、従来法との相関は良好( $r = 0.92$ )であり、これらダイオキシン類の TEQ 濃度を把握するためのスクリーニング法として期待できた(図 3(a))。さらに、Mono-ortho PCBs を含めたダイオキシン類の測定値と比較した場合も、良好な相関( $r = 0.88$ )が得られたことから(図 3(b))、TEF が定められている全異性体の TEQ 濃度のスクリーニング法としても有用であることが示唆された。

本研究では並行して行った操作ブランクにブランク値が認められたため、魚試料の測定値はブランク値を差し引いて数値化した。ブランク値は試

料中の濃度に換算すると、5.1 pg Ah immunoassay-based TEQ/g に相当し、比較的高い値であった。従って、低濃度汚染の魚試料を数値化する際は、注意が必要であると考えられる。本研究では操作ブランクの試行回数が1回であるため、ブランク値のばらつきを考慮した本法の検出及び定量下限値は算出できない。高いブランク値が認められた原因としては、本法は AhR に結合しアゴニスト作用を発揮する化合物は全て検出してしまうため、このような作用を有する何らかの化合物が前処理操作中に混入し、ブランク値を上昇させたと考えられる。なお、操作ブランクにダイオキシン類の高濃度の汚染は認められなかった(データ未掲載)。

現在、日本においては食品中のダイオキシン類に関する規制値はない。しかし、EU では、2002 年 7 月より食品中ダイオキシン類の規制値が施行されている<sup>4)</sup>。将来、食品に対し規制値が定められた場合は、現在の公定法である HRGS/HRMS 分析だけで対処することは困難であり、スクリーニング法の開発が強く望まれている。今後は、ブランク試験を複数回行い検出・定量下限値の設定及び添加回収試験等のバリデーションデータの収集を図り、Ah イムノアッセイの食品中ダイオキシン類分析へ応用性を高めていくことが必要と考えられる。

## D. 結論

- 1) 従来法である HRGC/HRMS 分析と比較試験を行った結果、良好な相関( $r = 0.92$ )が得られ、TEQ 量を推測するスクリーニング法として適した性質を有していた。
- 2) Ah イムノアッセイは簡便(6 時間で測定)かつ安価(1検体あたり数万円)でダイオキシン類の測定が可能であり、食品中ダイオキシン類のスクリーニング法として期待できる。
- 3) 操作ブランク値が高く、低濃度の検体では数値化するにあたって注意が必要である。今後はブランク値を考慮した検出及び定量下限値の設定が必要であると考えられる。

## E. 参考文献

- 1) Tsutsumi T, Iida T, Hori T, Nakagawa R, Tobiishi K, Yanagi T, Kono Y, Uchibe H, Matsuda R, Sasaki K, Toyoda M. Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan.

Chemosphere, 45 (2001) 1129-1137.

reduce dioxin in food and feed, 20 July.

- 2) 厚生省生活衛生局“食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法暫定ガイドライン”平成11年10月
- 3) 中西俊夫、小林康男、中尾晃幸、宮田秀明: Ah イムノアッセイ™によるダイオキシン類簡易測定技術の実証研究 -Ahレセプターに対する Co-PCBs のアンタゴニスト効果- 第11回環境化学討論会講演要旨集(2002) 84-85.
- 4) EU, 2001. Commission proposes strategy to

## F.研究業績

### 1.論文発表

なし

### 2.学会発表

なし

表1 前処理操作におけるダイオキシン類の回収率<sup>1)</sup>

	Compounds	Recovery, % ( <i>n</i> = 1)	
		2%ジクロロメタン /ヘキサン	60%ジクロロメタン /ヘキサン(測定分画)
PCDDs	2378-TCDD	— <sup>2)</sup>	78.0
	12378-PeCDD	—	83.6
	123478-HxCDD	—	93.8
	123678-HxCDD	—	81.3
	123789-HxCDD	—	78.5
	1234678-HpCDD	—	78.7
	OCDD	—	76.9
PCDFs	2378-TCDF	—	77.5
	12378-PeCDF	—	82.3
	23478-PeCDF	—	86.8
	123478-HxCDF	—	80.1
	123678-HxCDF	—	90.2
	123789-HxCDF	—	90.0
	234678-HxCDF	—	79.6
	1234678-HpCDF	—	98.1
	1234789-HpCDF	—	85.4
	OCDF	—	85.2
Co-PCBs	Non-ortho 3,3',4,4'-TCB (#77)	—	78.0
	3,4,4',5-TCB (#81)	—	72.9
	3,3',4,4',5-PeCB (#126)	—	73.2
	3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	—	96.5
	Mono-ortho 2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	83.2	7.6
	2,3,4,4',5-PeCB (#114)	85.0	1.1
	2,3',4,4',5-PeCB (#118)	84.8	0.9
	2',3,4,4',5-PeCB (#123)	86.4	1.0
	2,3,3',4,4',5-HxCB (#156)	93.7	2.5
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	96.4	3.2
2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	88.0	1.3	
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	91.7	1.4	

1) 既知量(40-200 pg)のダイオキシン類混合液をアルカリ分解液に添加し、一連の前処理を行った後、HRGC/HRMSにより回収率を算出した。なお、試料マトリックスを含まないため、アルカリ処理時間は0hrとした。

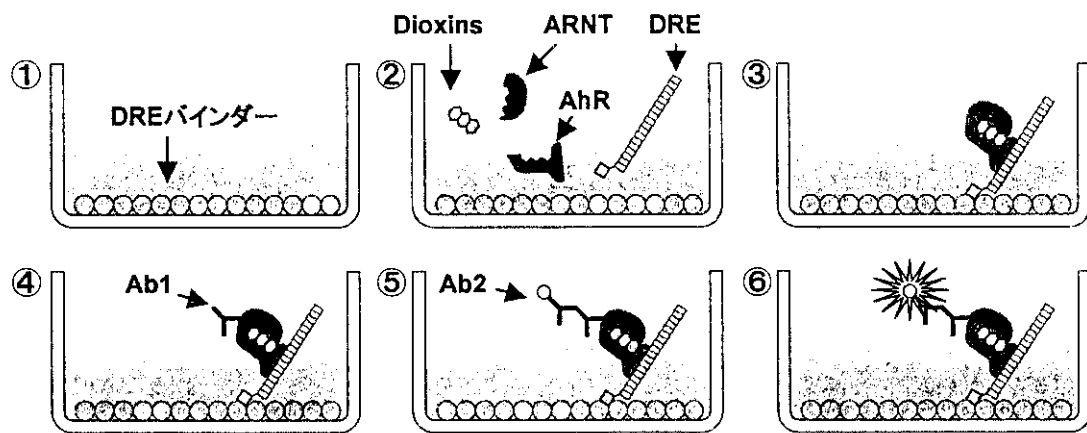
2) 未検出のため算出不能。

表2 AhイムノアッセイとHRGC/HRMS分析のダイオキシン類分析の比較

Samples	pg TEQ/g on fresh weight basis		
	Ah immunoassay <sup>1)</sup>	HRGC/HRMS	
		PCDD/Fs + non-ortho PCBs	PCDD/Fs + non/mono-ortho PCBs
1 カツオ	0.30	0.27	0.31
2 "	1.3	0.39	0.43
3 サバ	4.2	1.6	1.8
4 "	0 <sup>2)</sup>	0.25	0.28
5 サーモン	5.3	2.2	2.8
6 "	0.60	0.85	1.1
7 タラ	1.2	1.4	2.4
8 "	1.8	1.8	3.1
9 ブリ	11	3.9	4.5
10 "	11	4.9	5.8
11 マグロ	0.70	0	<0.01
12 "	6.5	3.2	3.7
13 "	4.3	3.4	3.9

1)操作ブランク値(5.1 pg TEQ/g)を引いた測定値を示す。

2)操作ブランク値を引いた結果、負の値(-0.40)が得られたため0として表した。



- ①DREバインダーが固相化されたマイクロプレートを準備する。
- ②検体あるいは標準液(2378-TCDD)と、モルモットのサイトソル(AhRを含む)、ARNT及びDREの混合物を加える。

↓ 2時間インキュベート

- ③DioxinsとAhRが結合後、ARNTと複合物を形成し、固相化されたDREに結合する。

↓

- ④1次抗体(anti-ARNT)を加え、反応させる。

↓ 1時間インキュベート

- ⑤アルカリフォスファターゼ標識した2次抗体を加え、反応させる。

↓ 1時間インキュベート

- ⑥発色試薬を添加後、吸光度(405 nm)を測定する。

図1 Ah免疫アッセイ原理

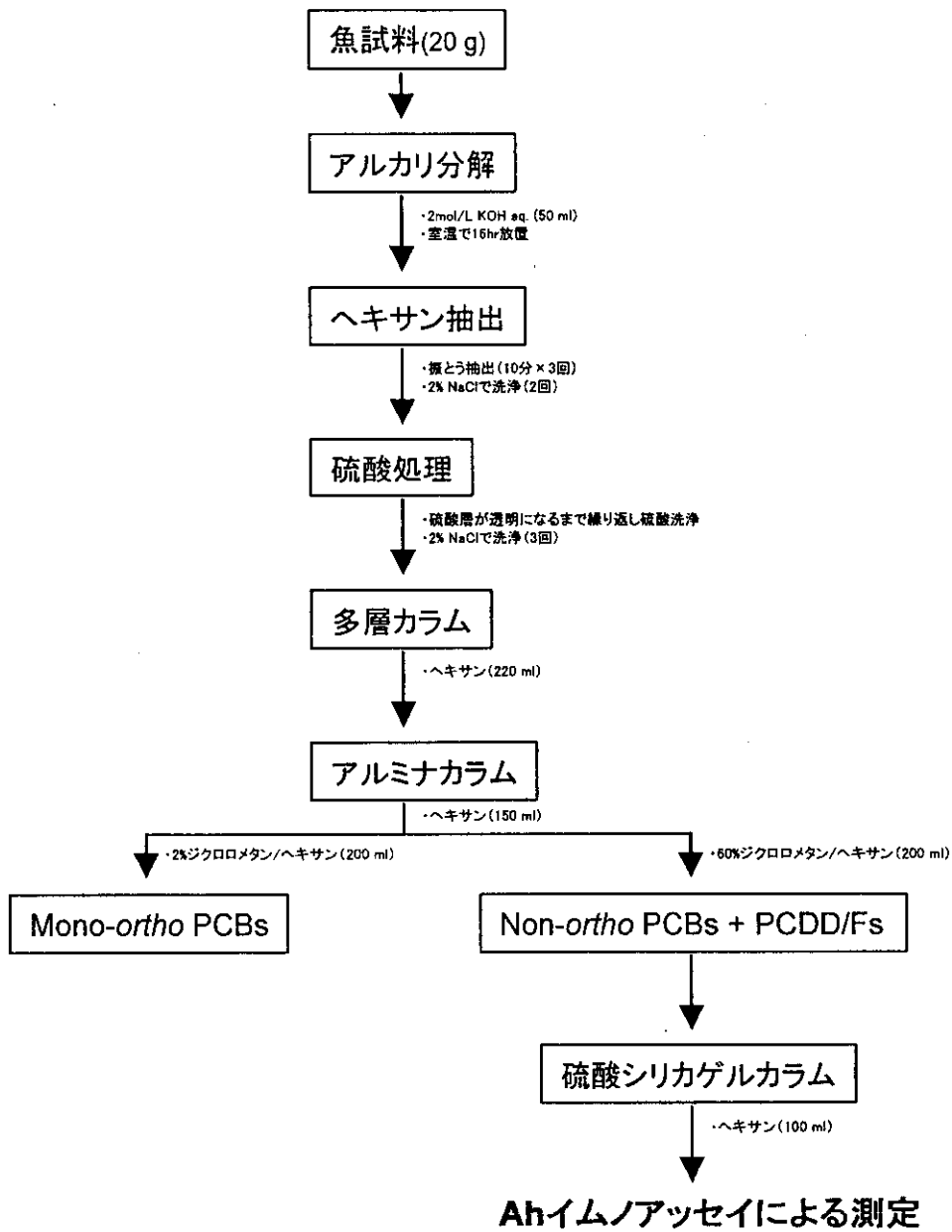


図2 前処理方法の概略



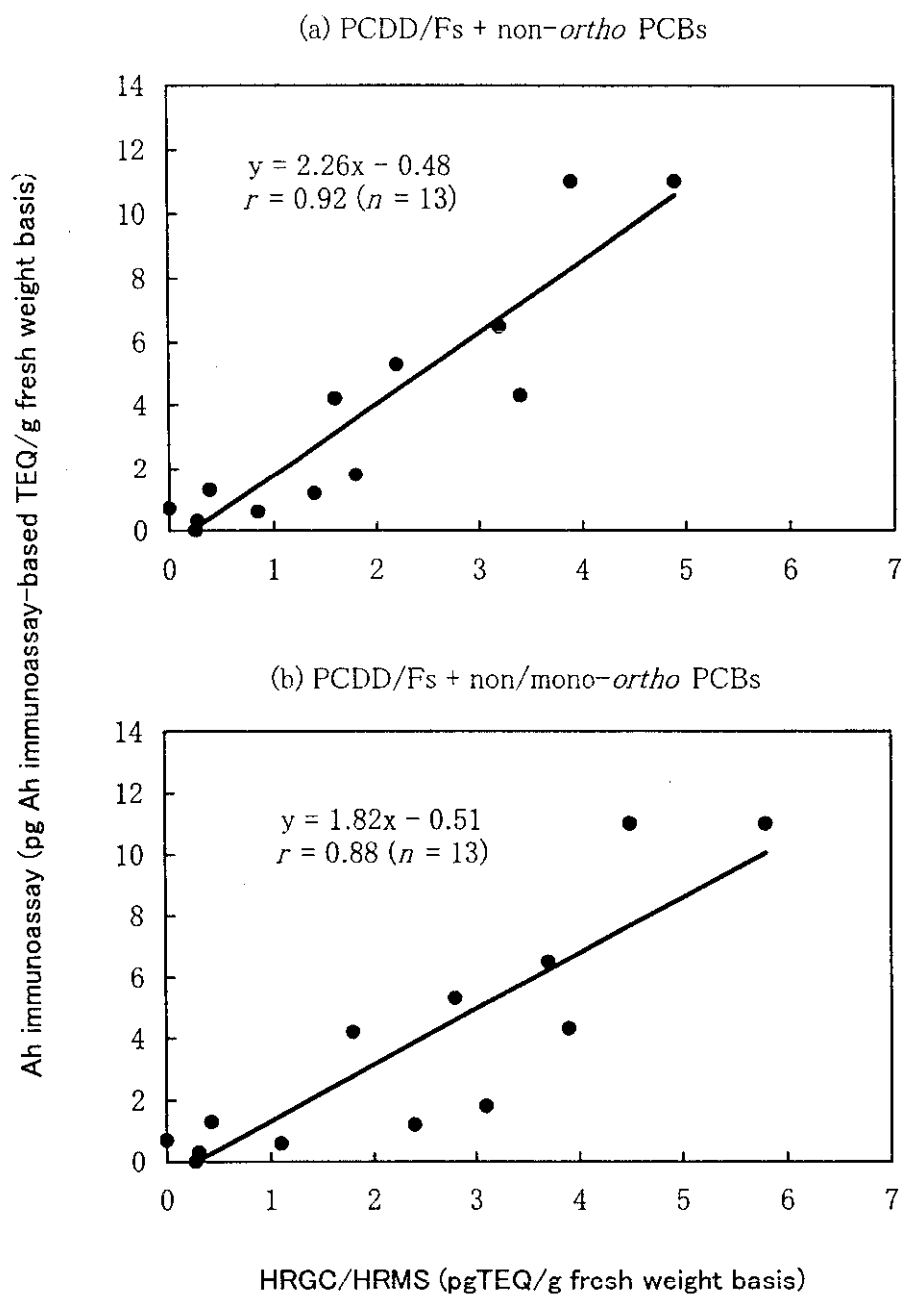


図3 Ah免疫アッセイとHRGC/HRMS分析による市販魚中ダイオキシン類測定値の相関

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)  
分担研究報告書

ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究

(3)ダイオキシン類の迅速測定法及び分析の精密化に関する研究  
(3-2)食品中のダイオキシン類分析におけるアルカリ分解・溶媒抽出法の評価

分担研究者 豊田正武 実践女子大学教授(元国立医薬品食品衛生研究所・食品部長)

研究要旨

アルカリ(水酸化カリウム水溶液)分解・ヘキサン抽出法の食品中ダイオキシン類分析における評価を行った。アルカリ分解のダイオキシン類(17種 PCDD/Fs 及び 12種 Co-PCBs)に対する影響を実試料に対する添加回収試験により検討したところ、ほとんどの検体で良好な回収率(79-107%)が得られ、アルカリ分解によるダイオキシン類の分解は認められなかった。マグロでは、アルカリ分解による OCDF の損失(回収率<61%)が認められたが、対応するクリーンアップスパイクをアルカリ分解前に加えることで、定量値への影響は防止することができた。また、一般的な抽出法であるソックスレー抽出と魚試料を用いて比較試験を行ったところ、同等のダイオキシン類定量値が得られた。さらに、本法を用いてダイオキシン類濃度の認証値つき試料を分析したところ、ほとんどの場合で認証範囲内の定量値が得られた。本法は特別な器具を必要とせず、操作が簡便であることから有用な方法であると考えられる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所・食品部  
堤 智昭、天倉吉章

A.研究目的

魚介類・乳製品等の食品はダイオキシン類の主要な摂取経路であり、汚染実態を把握することが重要な課題となっている<sup>1)</sup>。これら食品中のダイオキシン類分析では、試料由来の強力なマトリックスのため、アルカリ分解によりマトリックスを分解後、溶媒抽出を行う方法が汎用されている。しかし、高温条件でアルカリ分解を行った場合は、一部の高塩素化ダイオキシン類が損失する恐れが指摘されている<sup>2-5)</sup>。日本においては、室温条件でアルカリ分解後、ヘキサン抽出する方法が汎用されているが、ダイオキシン類分析に対する詳細な評価は行われていない。

そこで、本研究では汎用されている方法の一つである、水酸化カリウム水溶液分解(室温で一晩放置条件)・ヘキサン抽出法のダイオキシン類分析における評価を行った。

B.研究方法

1.試薬、試液及び器具

使用した溶媒は、全てダイオキシン類分析用(関東化学㈱)を使用した。シリカゲルは PCB 分析用(和光純薬工業㈱)、10%硝酸シリカゲルはダイオキシン分析用(和光純薬工業㈱)、アルミナはダイオキシン分析用(ICN 社)、活性炭は活性炭分散シリカゲル(関東化学㈱)を使用し、各カラムは食品のダイオキシン分析暫定ガイドライン<sup>6)</sup>に従い作製した。ダイオキシン類標準品は Wellington 社製を使用した。

2.試料

牛乳及び魚試料(スズキ、ムキカレイ及びマグロ(赤身))は、東京都内のスーパーマーケットで購入した。魚試料は筋肉部を採取後、ホモジナイザーで均一化し使用した。また、アルカリ分解・ヘキサン抽出法とソックスレー抽出法の比較試験には、スズキ試料を凍結乾燥し、使用した。認証試料は CRM607 (European Commission) と、CARP-1 (National Research Council Canada) を購入し使用

した。

### 3.装置

ホモジナイザーは(株)日本精機製作所製マルチブレンダーミルを用いた。また、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)は日本電子製(JMS-700)を使用した。

### 4.水酸化カリウム水溶液分解・ヘキサン抽出

魚試料にクリーンアップスパイク(CS)(WHO-TEFが定められている17種PCDD/Fs及び12種Co-PCBsの<sup>13</sup>Cラベル化異性体混合液)を添加した。2 mol/L水酸化カリウム水溶液(200 ml)を加えた後、室温で16時間放置し、アルカリ分解を行った。アルカリ分解後、メタノール(150 ml)を加え、ヘキサン(100 ml)で振とう抽出(10分×3回)を行った。その後、抽出液は2%(w/v)塩化ナトリウム水溶液(150 ml)により2回洗浄した。

### 5.ソックスレー抽出

魚試料(凍結乾燥品)にCS添加後、ソックスレー抽出(アセトン/ヘキサン=1/1(300 ml)により16時間抽出)を行った。抽出液は減圧濃縮し、ヘキサン(200 ml)に溶媒置換した。

### 6.クリーンアップ及びHRGC/HRMS分析

平成13年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)分担研究報告書(1-2)(ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究)と同様に行った。

### 7.添加回収試験

既知量のダイオキシン類混合液(17種PCDD/Fs及び12種Co-PCBs)を実試料(牛乳、スズキ、カレイ及びマグロ、各100 g)に添加し、上述したアルカリ分解を行った。試料中におけるダイオキシン類の添加濃度は、0.8~4.0 pg/gであった。アルカリ処理後、CSを添加し精製及びダイオキシン類の定量を行った。また、他の汎用されているアルカリ分解条件である、1 mol/L水酸化カリウムエタノール溶液(200 ml)による室温放置条件(約16時間)についても、本アルカリ分解と比較のため、一部の試料について適用した。無添加試料からダイオキシン類が定量された場合は、添加試料から定量値を差し引いて回収率を求めた。

## C.研究結果及び考察

### 1.アルカリ分解がダイオキシン類に与える影響

アルカリ分解がダイオキシン類に与える影響を、実試料に対するダイオキシン類(29異性体混合物)の添加回収試験により検討した。表1には、各試料を室温でアルカリ分解した後の平均回収率を示した。水酸化カリウム水溶液分解では、マグロを除き良好な回収率(79-107%)が添加した全異性体について得られた。マグロ#1ではOCDFの損失(回収率61%)が認められ、同様の傾向が異なるマグロ#2でも確認された。OCDFの損失が認められた場合でも、低塩素側の異性体(TCDF-HpCDFs)の回収率に大きな上昇が見られないことから、脱塩素反応による低塩素側の2,3,7,8位塩素置換体の生成は生じていないようであった。なお、マグロ#2の括弧内に示したように、定法どおりアルカリ処理前にCSを添加した場合は、OCDFの損失は対応する<sup>13</sup>CラベルOCDFにより補正されるため、定量値への影響は防止できた(99%)。この場合における<sup>13</sup>CラベルOCDFの回収率は、アルカリ分解中に損失するため他の<sup>13</sup>Cラベル異性体よりも低くなったが、ガイドライン<sup>6)</sup>の下限值以上(>40%)の数値であった。

他の汎用されているアルカリ分解条件である、水酸化カリウムエタノール溶液を用いた場合は、マグロにおけるOCDFの損失はさらに大きくなった。さらに、他の高塩素化PCDFs(1,2,3,4,7,8,9-HpCDF)についても損失が認められた。一部の低塩素側のPCDFs異性体(1,2,3,7,8-及び2,3,4,7,8-PeCDFs)の回収率が100%を大きく超えていることから、高塩素化PCDFsの損失に脱塩素反応が関わっていると考えられた。

図1には、OCDF損失が認められたマグロ#2において、添加したダイオキシン類(2,3,7,8位塩素置換体)以外の低塩素側ダイオキシン類の生成が生じていないか確認するため、SIMクロマトグラム(TCDFs-HpCDFs)を示した。本アルカリ分解では、OCDFの損失が生じたにもかかわらず、新たな低塩素側の異性体の生成は認められなかった(図1(a))。従って、本アルカリ分解のOCDFの損失メカニズムは脱塩素反応によるものでない可能性が示唆された。一方、水酸化カリウムエタノール溶液を使用した場合は、添加したダイオキシン類以外の異性体(アスタリスクを付けたピーク)が多く認めら

れた。これらの異性体は未添加試料に存在しないことから、アルカリ分解中に脱塩素反応により生じたと考えられる。

## 2. アルカリ分解・溶媒抽出法とソックスレー抽出法のダイオキシン類定量値の比較

本アルカリ分解・ヘキサン抽出法のダイオキシン類分析における信頼性を検討するため、本法とソックスレー抽出法のダイオキシン類定量値の比較を行った。表 2 には、同一のスズキ試料を分析した時の、両法におけるダイオキシン類の平均定量値及び標準偏差を示した。本法により得られた平均値はソックスレー抽出の平均値と非常に近く、標準偏差も同程度であった。また、CS の回収率も本法で 54-105%、ソックスレー抽出法で 62-105%と同程度の範囲であった。

さらに、両法により得られた SIM クロマトグラムにも、大きな違いは認められなかった。最も複雑なクロマトグラムのパターンが得られた PeCDFs 及び mono-ortho PeCBs の SIM クロマトグラムを、図 2 に示した。このように、本法により得られたクロマトグラムのパターンは、ソックスレー抽出法の場合とほぼ同一であり、定量ピークに対する夾雑物の妨害ピークは認められなかった。以上の結果より、本法を用いた場合でも、一般的な他の方法と同等のダイオキシン類定量値が得られると考えられる。

## 3. アルカリ分解・溶媒抽出法による認証試料のダイオキシン類分析

ダイオキシン類分析における信頼性をより評価するため、本法により 2 種類のダイオキシン類の認証試料を分析した。表 3(a)には、本法による粉乳試料(CRM-607)の定量値と認証値を示した。粉乳試料の分析は 2 回行い、ほとんどの異性体の定量値が認証値の範囲内であった。一部の異性体(1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF 及び 1,2,3,4,7,8-HxCDF)の定量値が認証値の範囲から外れたが、そのずれは小さかった。また、表 3(b)には、本法による鯉試料(CARP-1)の定量値と認証値を示した。鯉試料の分析は 3 回行い、全ての定量値が認証値の範囲内であった。このように本法を用いた場合でも認証値に近い定量値が得られ、さらに本法は特別な器具を必要とせず、操作が簡便であることから有用な方法であると考えられる。

## D. 結論

- 1) 水酸化カリウム水溶液によるアルカリ分解法は、ほとんどの検体でダイオキシン類の損失を生じさせず、マトリックスを分解することが可能であった。
- 2) マグロでは本アルカリ分解による OCDF の損失が認められたが、CS で補正されるため定量値への影響は防止できた。
- 3) 本アルカリ分解後にヘキサン抽出を行うことで、他の抽出法と比較し、同等のダイオキシン類定量値が得られた。さらに、本法により認証試料を分析した結果、認証値に近い定量値が得られた。本法は特別な器具を必要とせず、操作が簡便であることから有用な方法と考えられる。

## E. 参考文献

- 1) Tsutsumi T, Iida T, Hori T, Nakagawa R, Tobiishi K, Yanagi T, Kono Y, Uchibe H, Matsuda R, Sasaki K, Toyoda M. Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere*, **45** (2001) 1129-1137.
- 2) Ryan JJ, Lizotte R, Panopio LG, Lau BPY, Masuda Y. The effect of strong alkali on the determination of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs). *Chemosphere*, **18** (1989) 149-154.
- 3) Firestone D. Determination of dioxins and furans in foods and biological tissues: review and update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74** (1991) 375-384.
- 4) 高菅卓三、青野さや香、秋月哲也、中川貴之、渡邊清彦、井上毅:アルカリ分解法を用いた PCB、ダイオキシン分析の課題. 第 10 回環境化学討論会講演要旨集(2001) 28-29.
- 5) 大高広明、牧野和夫:生体試料のダイオキシン類分析における加熱アルカリ分解法の可否について. 第 10 回環境化学討論会講演要旨集(2001) 128-129.
- 6) 厚生省生活衛生局“食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCB の測定方法暫定ガイドライン”平成 11 年 10 月

## F.研究業績

### 1.論文発表

1) Tsutsumi T, Amakura Y, Sasaki K, Toyoda M, Maitani T. Evaluation of an aqueous KOH digestion followed by hexane extraction for analysis of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retailed fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375 (2003)

792-798.

### 2.学会発表

1) 堤 智昭、天倉吉章、佐々木久美子、豊田正武、米谷民雄. 食品中のダイオキシン類分析におけるアルカリ分解の影響. 第 11 回環境化学討論会 (2002.6)

表1 各試料のアルカリ分解後におけるダイオキシン類回収率<sup>a</sup>

Isomers	Recovery, % <sup>b</sup>					
	Aqueous KOH					Ethanol KOH
	牛乳	ムキカレイ	スズキ	マグロ#1	マグロ#2	マグロ#2
<b>PCDDs</b>						
2378-TCDD	93	106	95	97	84 (96) <sup>c</sup>	87
12378-PeCDD	96	100	99	92	96 (96)	92
123478-HxCDD	90	93	97	98	85 (96)	94
123678-HxCDD	94	96	91	91	93 (91)	97
123789-HxCDD	97	100	97	93	92 (100)	96
1234678-HpCDD	94	95	94	101	98 (101)	108
OCDD	99	100	101	85	97 (98)	87
<b>PCDFs</b>						
2378-TCDF	102	94	94	98	83 (89)	108
12378-PeCDF	96	98	104	86	97 (106)	142
23478-PeCDF	93	97	95	86	92 (100)	131
123478-HxCDF	101	96	99	88	103 (99)	74
123678-HxCDF	103	94	103	94	98 (102)	82
123789-HxCDF	98	104	101	85	91 (96)	62
234678-HxCDF	97	98	97	97	90 (95)	77
1234678-HpCDF	95	95	94	94	91 (101)	81
1234789-HpCDF	107	105	102	81	76 (97)	39
OCDF	92	96	90	61	57 (99)	15
<b>Non-ortho PCBs</b>						
33'44'-TCB (#77)	101	93	95	92	86 (100)	95
344'5'-TCB (#81)	101	101	100	93	80 (97)	93
33'44'5'-PeCB (#126)	96	101	91	89	88 (95)	95
33'44'55'-HxCB (#169)	83	79	83	93	80 (83)	79
<b>Mono-ortho PCBs</b>						
233'44'-PeCB (#105)	101	- <sup>d</sup>	-	91	93 (101)	104
2344'5'-PeCB (#114)	107	-	96	91	102 (108)	100
23'44'5'-PeCB (#118)	105	-	-	90	79 (89)	104
2'344'5'-PeCB (#123)	103	-	102	95	87 (105)	110
233'44'5'-HxCB (#156)	93	-	99	94	97 (96)	95
233'44'5'5'-HxCB (#157)	103	-	95	93	101 (108)	103
23'44'55'-HxCB (#167)	101	-	105	92	98 (103)	97
233'44'55'-HpCB (#189)	104	-	90	102	103 (97)	94

<sup>a</sup> ダイオキシン類標準混合液(29異性体)を各試料に添加(添加濃度は0.8-4.0 pg/g)

<sup>b</sup> Mean( $n = 2$ )

<sup>c</sup> クリーンアップスパイクをアルカリ分解前に添加した時の回収率

<sup>d</sup> 添加濃度に対し汚染濃度が高いため算出不能

表2 アルカリ分解・溶媒抽出とソックスレー抽出によるダイオキシン類測定値の比較 (スズキ)

Isomers	Dioxin levels, pg/g <sup>a</sup>				Ratio <sup>b</sup>
	アルカリ分解・溶媒抽出		ソックスレー抽出		
<b>PCDDs</b>					
2378-TCDD	0.19 ± 0.01	(85) <sup>c</sup>	0.20 ± 0.02	(89)	1.0
12378-PeCDD	0.74 ± 0.02	(91)	0.73 ± 0.05	(96)	1.0
123478-HxCDD	0.16 ± 0.01	(95)	0.18 ± 0.01	(92)	0.9
123678-HxCDD	0.54 ± 0.04	(92)	0.59 ± 0.03	(91)	0.9
123789-HxCDD	0.07 ± 0.01	(98)	0.08 ± 0.01	(100)	1.0
1234678-HpCDD	0.23 ± 0.01	(92)	0.27 ± 0.02	(85)	0.9
OCDD	0.62 ± 0.06	(65)	* <sup>d</sup>	(64)	-
<b>PCDFs</b>					
2378-TCDF	1.31 ± 0.05	(105)	1.49 ± 0.04	(99)	0.9
12378-PeCDF	0.39 ± 0.03	(90)	0.41 ± 0.01	(93)	1.0
23478-PeCDF	1.83 ± 0.07	(98)	2.10 ± 0.03	(91)	0.9
123478-HxCDF	0.14 ± 0.01	(90)	0.13 ± 0.00	(91)	1.1
123678-HxCDF	0.17 ± 0.01	(87)	0.16 ± 0.01	(85)	1.0
123789-HxCDF	<LOQ	(91)	<LOQ	(93)	-
234678-HxCDF	0.33 ± 0.01	(98)	0.33 ± 0.03	(95)	1.0
1234678-HpCDF	0.06 ± 0.01	(82)	0.06 ± 0.01	(75)	0.9
1234789-HpCDF	<LOQ	(83)	<LOQ	(85)	-
OCDF	<LOQ	(54)	<LOQ	(62)	-
<b>Non-ortho PCBs</b>					
33'44'-TCB (#77)	52.7 ± 1.7	(74)	57.8 ± 2.8	(78)	0.9
344'5'-TCB (#81)	2.4 ± 0.1	(75)	2.5 ± 0.2	(75)	0.9
33'44'5'-PeCB (#126)	33.4 ± 0.2	(86)	32.9 ± 0.9	(85)	1.0
33'44'55'-HxCB (#169)	10.4 ± 0.1	(100)	9.9 ± 0.1	(105)	1.0
<b>Mono-ortho PCBs</b>					
233'44'-PeCB (#105)	1180.2 ± 14.7	(88)	1118.8 ± 9.4	(82)	1.1
2344'5'-PeCB (#114)	87.4 ± 2.3	(93)	87.9 ± 6.2	(86)	1.0
23'44'5'-PeCB (#118)	3588.6 ± 100.5	(94)	3532.9 ± 104.7	(91)	1.0
2'344'5'-PeCB (#123)	57.5 ± 2.9	(90)	57.3 ± 4.7	(90)	1.0
233'44'5'-HxCB (#156)	490.8 ± 16.9	(96)	466.8 ± 6.4	(91)	1.1
233'44'5'5'-HxCB (#157)	127.8 ± 6.1	(95)	116.8 ± 3.0	(88)	1.1
23'44'55'-HxCB (#167)	245.7 ± 7.1	(94)	248.3 ± 7.5	(92)	1.0
233'44'55'-HpCB (#189)	58.5 ± 0.4	(103)	62.3 ± 4.4	(92)	0.9

<sup>a</sup> Mean ± SD (n = 3)

<sup>b</sup> アルカリ分解測定値/ソックスレー抽出測定値

<sup>c</sup> クリーンアップスパイクの平均回収率

<sup>d</sup> 高い操作ブランクが認められたため数値化不能

表3 アルカリ処理・溶媒抽出による認証検体のダイオキシン類測定値

a) 粉乳試料(CRM-607)

Isomers	Measured conc., pg/g		Certified conc., pg/g	
	1st	2nd	Mean	Uncertainty <sup>a</sup>
<b>PCDDs</b>				
2378-TCDD	0.25	0.24	0.25	0.03
12378-PeCDD	<u>0.74</u> <sup>b</sup>	0.76	0.79	0.04
123478-HxCDD	0.45	0.44	0.42	0.07
123678-HxCDD	0.88	0.90	0.98	0.11
123789-HxCDD	0.30	0.33	0.34	0.05
<b>PCDFs</b>				
2378-TCDF	0.03	0.03	0.05	0.03
12378-PeCDF	0.05	0.05	0.054	0.013
23478-PeCDF	<u>1.50</u>	<u>1.67</u>	1.81	0.13
123478-HxCDF	<u>0.84</u>	<u>0.79</u>	0.94	0.04
123678-HxCDF	0.94	0.98	1.01	0.09
234678-HxCDF	1.04	1.09	1.07	0.05

<sup>a</sup> 95%信頼区間

<sup>b</sup> 95%信頼区間外の値

b) 鯉試料(CARP-1)

Isomers	Measured conc., pg/g <sup>a</sup>		Certified conc., pg/g	
	Mean	Range	Mean	Uncertainty <sup>b</sup>
<b>PCDDs</b>				
2378-TCDD	6.19	6.02 - 6.31	6.6	0.6
12378-PeCDD	3.86	3.68 - 4.04	4.4	1.1
123478-HxCDD	1.89	1.76 - 2.01	1.9	0.7
123678-HxCDD	5.36	5.24 - 5.45	5.6	1.3
123789-HxCDD	0.63	0.61 - 0.66	0.7	0.4
1234678-HpCDD	5.78	5.65 - 6.04	6.5	1.8
OCDD	5.00	4.97 - 5.05	6.3	1.9
<b>PCDFs</b>				
2378-TCDF	10.58	10.40 - 10.78	11.9	2.7
12378-PeCDF	4.37	4.26 - 4.52	5.0	2.0
<b>Mono-ortho PCBs</b>				
233'44'-PeCB (#105)	58306	57447 - 59773	54000	24000
23'44'5'-PeCB (#118)	152752	151422 - 153752	132000	60000

<sup>a</sup> n = 3

<sup>b</sup> 95%信頼区間



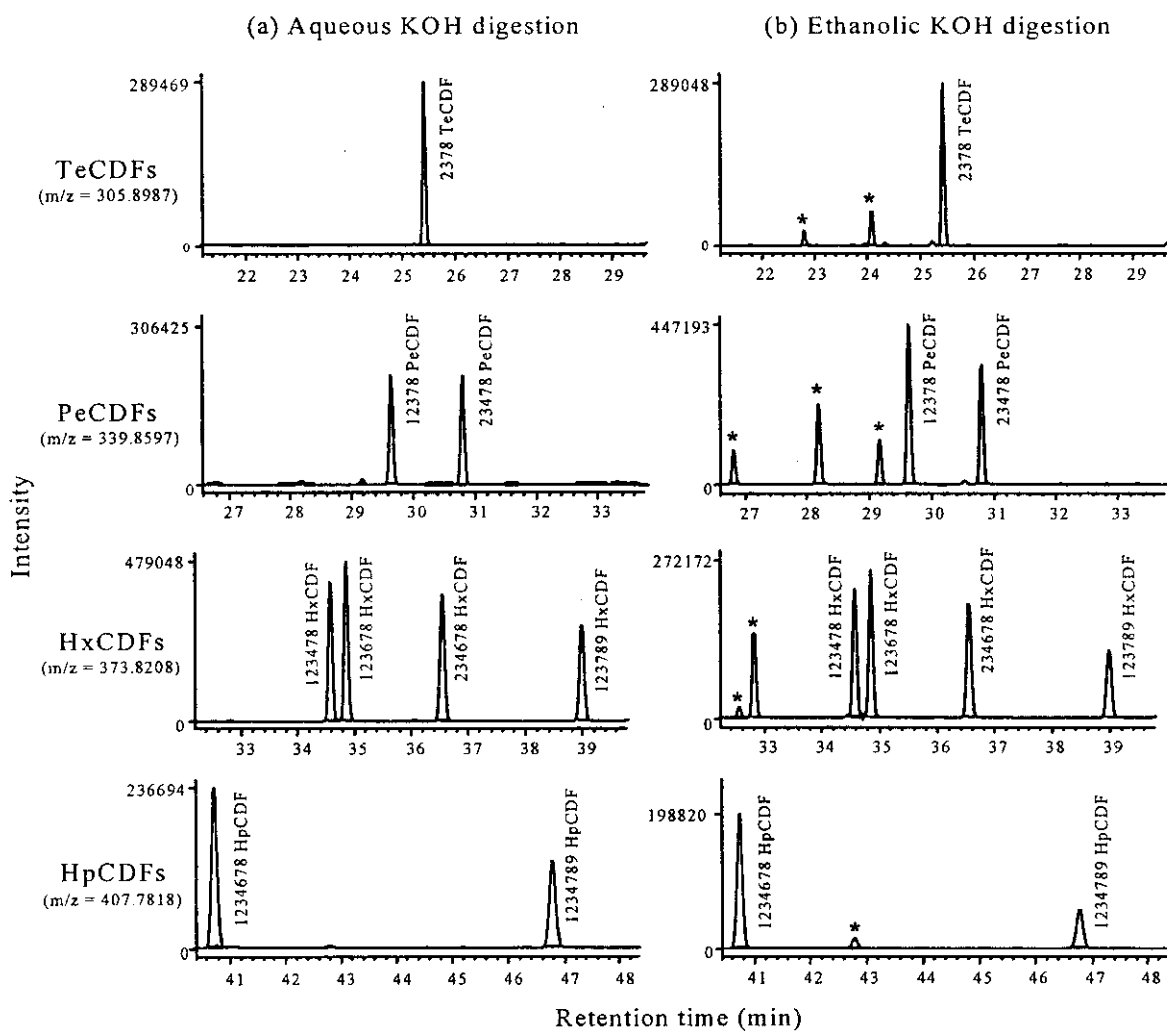


図 1 ダイオキシン類を添加したマグロ試料の SIM クロマトグラム (tetra- to heptachlorinated dibenzofurans) : (a) KOH 水溶液分解; (b) KOH エタノール溶液分解. アルカリ分解により新たに認められたピークはアスタリスクを付けた。

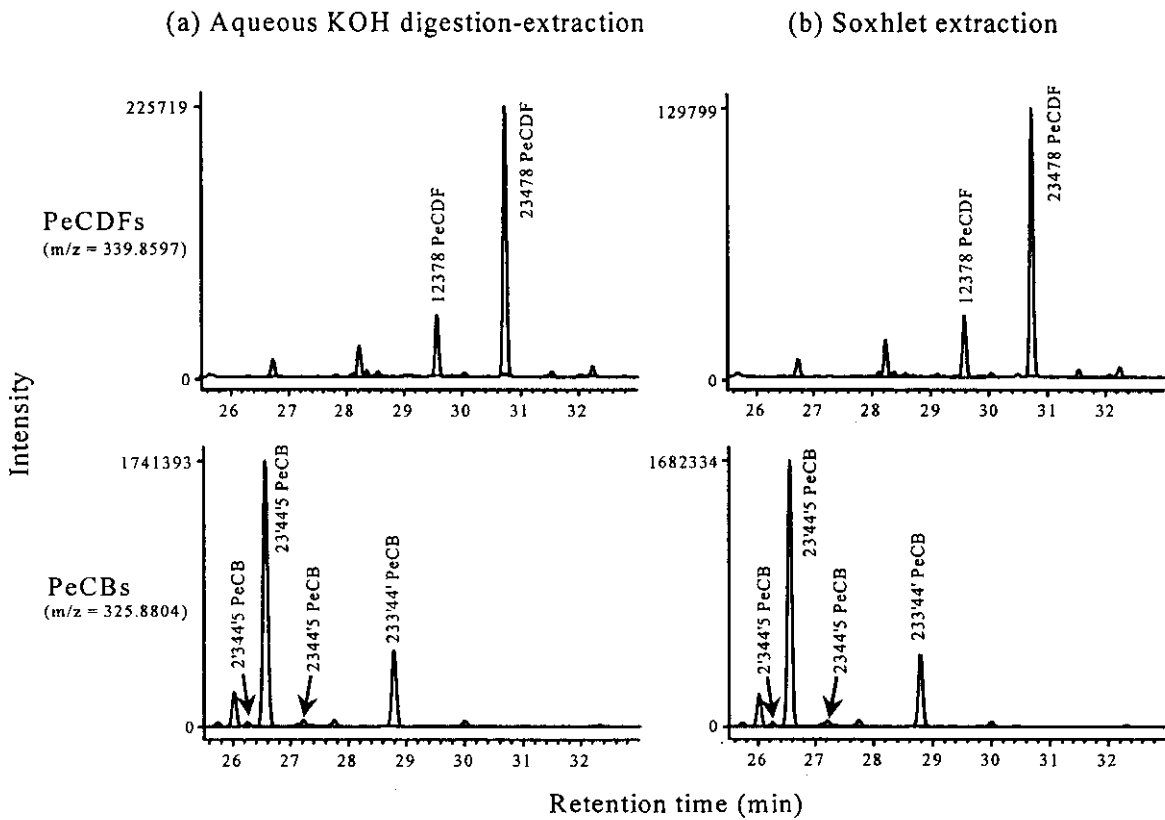


図2 スズキ試料における PeCDFs と mono-*ortho* PeCBs の SIM クロマトグラム: (a) アルカリ分解・溶媒抽出; (b) ソックスレー抽出.